

J. W. Suh Patent Law Office
徐種完 國際特許法律事務所

7th Fl., New-Seoul Building
 828-8, Yeoksam-Dong, Kangnam-Ku,
 Seoul, 135-080, Korea
 TEL : 82-2-539-1970
 FAX : 82-2-552-5108
 82-2-563-5108

서울특별시 강남구 역삼동
 828-8호 뉴서울빌딩 701호
 TEL : (02) 539-1970
 FAX : (02) 552-5108
 (02) 563-5108

JWS : 2001-8-674

2001년 8월 27일

수 신 : 경희대 치대 약리학 교실

참 조 : 김 성 진 교수님

명 칭 : 세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물

제 목 : 특허출원 제2001-50670호의 출원 완료 통보

당소파일번호 : 2001-DP-124

1. 교수님의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 교수님의 의뢰에 따라 다음과 같이 특허출원을 하였음을 알려드립니다.

- 다 음 -

출원인	출원번호	출원일자	발명의명칭	우선권 주장	심사 청구
김성진	제2001-50670호	2001.08.22.	세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물	있음 (2001-12840)	있음

3. 본 건의 출원공개는 최초 출원일로부터 1년 6개월경과 후(2003년 2월 22일)이며, 특허공
 개공보에 그 출원내용이 공개됩니다.

4. 본 특허출원에 대한 특허청의 조치가 있는 대로 그 진행상황을 계속 알려드리겠습니다.

서종완 국제특허법률사무소
 변 리 사 서 종 완



※ 첨부서류 : 1. 출원서 사본 1부
 2. 출원번호통지서 1부
 3. 청구서 1부

BEST AVAILABLE COPY



919980002838



10111010000000000000

방식심사관	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2001.08.22

【국제특허분류】 A61K

【발명의 국문명칭】 세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용
조성물

【발명의 영문명칭】 Composition containing Asiasari Radix extracts for
protecting brain cells and improving memory

【출원인】

【성명】 김성진

【출원인코드】 4-1998-044990-1

【대리인】

【성명】 서종완

【대리인코드】 9-1998-000283-8

【포괄위임등록번호】 1999-058149-1

【발명자】

【성명】 김성진

【출원인코드】 4-1998-044990-1

【우선권주장】

【출원국명】 KR

【출원종류】 특허

【출원번호】 10-2001-0012840

【출원일자】 2001.03.13

【증명서류】 첨부

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

서종완 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 14 면 14,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 10 항 429,000 원

【합계】 498,000 원

【감면사유】 개인(70%감면)

【감면후 수수료】 167,600 원

【첨부서류】 1.요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에 관한 것으로, 각종 스트레스, 음주, 흡연 등 환경적 요인으로 인하여 뇌손상을 받고 있는 현대인들의 뇌세포 보호효과를 유발하여 퇴행성 질환의 예방 및 치료와 기억력 증진 효과를 유발하는 약제 및 건강보조식품에 이용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

세신, 뇌세포 보호, 기억증진

【명세서】

【발명의 명칭】

세신추출물을 함유하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물{Composition containing Asiasari Radix extracts for protecting brain cells and improving memory}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 세신추출물(분획 1)의 AMPA에 의한 신경세포 탈분극 억제효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차(n=5)이며, 대조군에 대한 유의성은 *: $P<0.05$ 이다.

도 2은 세신추출물(분획 4)의 AMPA에 의한 신경세포 탈분극 억제효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차(n=5)이며, 대조군에 대한 유의성은 **: $P<0.01$ 이다.

도 3는 세신추출물(분획 1)의 AMPA에 의한 신경세포 손상에 대한 억제효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차(n=5)이며, 대조군에 대한 유의성은 ***: $P<0.001$ 이다.

도 4은 세신추출물(분획 2, 분획 3, 분획 4 및 분획 5)의 AMPA에 의한 신경세포 손상에 대한 억제효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차(n=5)이며, 대조군에 대한 유의성은 ***: $P<0.001$ 이다.

도 5는 세신추출물(분획 1)의 아교세포 보호효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차(n=5)이며, 동일한 글자를 나타내지 않는 것은 던칸 다중 범위

시험(Duncan's multiple range test)에 의하여 $P < 0.05$ 에서 서로 다름을 나타낸다.

도 6는 세신추출물(분획 1, 분획 2, 분획 3, 분획 4 및 분획 5)의 아교세포 보호효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차($n=5$)이며, 대조군에 대한 유의성은 *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$ 이다.

도 7은 세신추출물(분획 1)의 기억력 증진 효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차($n=8$)이며, 대조군에 대한 유의성은 **: $P < 0.01$ 이다.

도 8은 세신추출물(분획 2, 분획 3, 분획 4 및 분획 5)의 기억력 증진효과를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차($n=8$)이며, 대조군에 대한 유의성은 *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 이다.

도 9는 경구투여시 세신추출물(분획 2)의 기억력 증진효과(NaNO_2 시험)를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차($n=8$)이며, 대조군에 대한 유의성은 *: $P < 0.05$ 이다.

도 10는 경구투여시 세신추출물(분획 1, 분획 2 및 분획 4)의 기억력 증진효과(8방향 방사 미로시험)를 나타낸다. 나타낸 값은 평균± 표준편차($n=10$)이며, 대조군에 대한 유의성은 *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에

관한 것이다.

뇌세포의 손상에 관여 하는 중요한 인자중의 하나는 아미노산인 글루타메이트이다. 글루타메이트는 주로 4가지의 수용체 즉, NMDA수용체, AMPA수용체, 카이네이트(Kainate) 수용체 및 1S,3R-ACPD 수용체에 결합하여 작용을 나타낸다[Craig CR, Stitzel RE, Modern Pharmacology with clinical applications, 293-302, 1997]. 뇌허혈과 같은 자극이 있을 경우 뇌세포에 산소공급이 줄어들게 되고, 결과 협기성 해당작용이 증가하며, 조직내의 에너지원인 ATP가 줄어들어 이온펌프의 작용이 감소하게 되고, 세포외의 포타슘이온의 양이 증가하여 신경세포막의 탈분극이 유도된다. 이렇게 되면 흥분성 신경전달물질이 분비되어 NMDA, AMPA, 카이네이트 수용체의 활성화로 인하여 뇌손상이 일어나게 된다.

흥분성 신경 전달물질에 의한 흥분성 독성(excitotoxicity)은 세포 스트레스를 유발하여, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중 및 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등의 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disorders)과 같은 병리학적 상태를 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [Haloween, B., Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 59, 1609-1623, 1992; Coyle, J. T. 및 Puttfarcken, P., Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 262, 689-695, 1993; Olanow, C. W., A radical hypothesis for neurodegeneration. trends Neurosci. 16, 439-444, 1993]. 중추신경계의 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disorders)은 때로 기억과 인지기능의 저하를 수반한다. 특히, 치매는 현대와 같은

고령화 사회의 중대한 문제로서 그 원인으로 유전, 노화, 뇌손상, 흡연 및 음주와 같은 환경적 요인 및 기타 복합인자들을 들 수 있다. 주로 해마(hippocampus)가 많이 손상되며, 이는 일반적으로 뇌의 아세틸콜린 함량의 감소와 밀접한 관련성이 있다. 현재, 뇌의 아세틸콜린 양을 증가시키기 위하여 아세틸콜린 에스테라제 억제제(acetylcholine esterase inhibitor)들이 알츠하이머성 치매의 치료에 널리 사용되고 있는 실정이다.

이외에도, 이러한 뇌손상을 억제하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있으며[Gagliardi RJ, Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists, Arq. Neuro-Psiquiatr. 58, 2000], 예를 들어, NMDA 길항제, AMPA 길항제, GABA 효능제, 세포내 칼슘감소제, 산화질소(nitric oxide) 억제제, 유리 라디칼 제거제(free radical scavenger), 나트륨 채널 억제제, 글루타메이트 유리 억제제, 성장인자, 산성화(acidosis), 저체온법(hypothermia), 칼륨 채널 활성화제(potassium channel activators)등의 개발이 시도되고 있다.

그러나, NMDA 길항제로 도조사일핀(dozocylpin) (MK 801), 셀포텔(selfotel), 세레스테이트(cerestat), 텍스트로메톨판(dextrometorfan) 등이 개발되었으나, 이 약물들은 저용량으로 투여시, 지각인지의 변화, 불쾌감, 안구진탕증(nystagmus), 저혈압 등을 유발하며, 고용량으로 투여시 흥분, 집착(paranoia), 환각과 같은 정신적인 부작용을 나타낸다. 또한, MPA 길항제로 NBQX가 개발되었으나, 심각한 신장독성의 발현으로 의약품으로서의 실용가능성이 아주 낮다.

따라서, 독성이 없는 뇌보호제의 개발이 시급한 실정이다.

최근의 연구에 의하면, AMPA 수용체의 활성화에 의한 신경세포 손상은 특히, 알츠하이머병과 관련된 전뇌 기저 콜린성 뉴런(basal forebrain cholinergic neurons: BFCNs)에 선택적으로 발생함으로써, AMPA 수용체는 알츠하이머병의 발생에 아주 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이는 즉, AMPA 길항제를 이용하여 알츠하이머병 치료제 개발을 시도할 수 있음을 제시하고 있다[Weiss, J. H. et al., Basal forebrain cholinergic neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated neurotoxicity. Neuroscience 60, 659-664]..

아교세포는 신경세포의 생존에 결정적인 역할을 하고 있다. 발달과정의 중추 신경계에서는 신경세포의 정확한 이동과 증식을 지배하고, 발달후에는 신경세포의 항상성과 시냅스 유연성(synaptic plasticity)을 유지하는데 관여하고 있다. 또한 아교세포는 신경세포의 생존과 사멸에 필수적인 신경세포의 메시지를 개시할 수 있는 수용체와 신경전달 물질들을 함유하고 있다. 따라서 아교세포를 외부의 손상으로부터 보호하는 것은 결국 신경세포의 유연성, 항상성 및 생존과 연관된다 하겠다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 발명자들은, 각종 스트레스, 음주, 흡연 등 환경적 요인으로 인하여 뇌 손상을 받고 있는 현대인들의 뇌세포 보호효과 및 기억력 증진효과를 유발하는 물질에 대한 오랜 연구 결과, 세신 추출물이 뇌세포 보호작용과 더불어 기억력 증진에 우수한 효과를 나타내는 것을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명의 구성】

본 발명은 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물은, 조성물 총중량에 대하여 세신추출물을 0.5~ 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 한다.

세신(*Asiasari Radix*)은 족두리풀(*Asarum sieboldii* F. MAEKAWA, *Asarum sieboldii* var. *seoulense* Nakai, *Asarum sieboldii* Miq.), 민족두리풀(*Asarum heterotropoides* Schmidt, *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* Kitagawa, *Asarum heterotropoides* F. MAEKAWA var. *seoulensis* F. MAEKAWA)이라고도 한다. 다년생 초본으로 옆으로 뻗어나가는 근경은 비교적 짧고, 마디가 많고 지름이 1mm 내외의 잔뿌리를 달고 있다. 고르지 않게 구부러진 노끈 모양으로서 지름 3~ 5mm인 황갈색의 마디진 근경에 길이 5~ 20cm 내외의 뿌리가 많이 달려 있는데 색깔은 담갈색이고 밋밋하고 아주 얇은 세로 주름이 있다.

그 추출물은 메틸유게놀(methyleugenol), 아사릴케톤(asaryketone), 시네올(cineol), 사프롤(safrole), 리모넨(limonene), 유카반(eucarvone) 등의 정유; N-이소부틸 2,4,8,10-도데카테트라엔아미드, 펠리토린(pellitorin) 등의 산아미드(acid amide); (-) 아사리닌(asarinin), 세사민 (sesamin) 등의 리그난; 히겐아민(higenamine: 강심성분) 등의 알칼로이드; 등을 함유하며, 체온 강하, 진경, 항 히스타민작용, 강심작용을 나타내어, 국소마취, 진통, 해열, 진해, 거담 및 이

노 목적으로 응용되고 있다(Zhu Y, Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Application, Harwood Academic Publisher, pp66-69, 1998).

그러나, 지금까지 세신추출물이 뇌세포 보호 및 기억력 증진 효과가 있다는 보고는 없었다.

본 발명의 세신추출물은, 세신을 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트 등의 유기용매를 가하고 5 내지 80℃, 바람직하게는 30 내지 55℃에서 15분 내지 48시간, 바람직하게는 30분 내지 12시간 동안 추출함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다. 또한, 얻어진 추출물을 감압건조시켜 분말형태로 만들 수도 있다.

또한, 본 발명의 세신추출물은 다음의 방법으로 더욱 분획할 수 있다(Harborne J.B. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd Edt. pp 6-7, 1998).

본 발명의 세신추출물은, 상기 기재된 방법에 의해 세신으로부터 추출한 추출물을 메탄올:물 혼합용매에 녹이고, 산으로 pH 2~ 4로 조절하여 동량의 클로로포름으로 추출한 후, 클로로포름에 용해되지 않는 분획부를 수산화암모늄으로 pH 9~ 12로 조절하여 동량의 클로로포름:메탄올 혼합용매로 추출하고, 이중 클로로포름:메탄올 혼합용매에 용해되지 않는 분획부를 메탄올로 더 추출하여 분획함으로서 제조되는 것을 특징으로 한다.

이때 클로로포름:메탄올 혼합용매의 혼합비는 1:0.1~ 1의 범위로 하는 것이 바람직하다. 상기 클로로포름에 용해되지 않은 분획부 중 클로로포름:메탄올 혼합용매로 추출시 용해된 분획부에는 대부분의 알칼로이드(alkaloids)들이 함유되어 있으며, 클로로포름:메탄올 혼합용매에 용해되지 않는 분획부에는 4급 알칼로이드(quaternary alkaloids) 및 N-Oxide들이 함유되어 있다.

본 발명의 세신추출물을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 세신추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘, 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

본 발명에 따른 세신추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

세신추출물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 500 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 세신 추출물 및

분획물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 세신추출물을 포함하는 조성물은 상기와 같은 제형으로 뇌세포 보호 및 기억력 증진을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 세신 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이다.

또한, 본 발명은 세신을 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트 등의 유기용매의 추출용매로 추출하고, 이로부터 얻어진 세신추출물을 메탄올:물 혼합용매에 녹인 후 산으로 pH 2~4로 조절하고, 동량의 클로로포름으로 더 추출함으로써 얻어진 분획물을 포함하는 것을 특징으로 하는 기억력 증진용 조성물에 관한 것이다.

이때, 메탄올:물 혼합용매의 혼합비는 1:0.2~ 1.5의 범위인 것이 바람직하며, 이 분획물에는 테르페노이드(terpenoids) 및 페놀성(phenolic) 물질들이 함유된다.

본 발명의 기억력 증진용 조성물은, 상기 분획물을 조성물 총중량에 대하여 0.5~ 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 한다.

상기 세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물과 동일하게, 본 발명의 기억력 증진용 조성물은 다른 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 또한 통상의 방법에 따라 여러 형태로 제형화되어 기억력 증진을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다.

본 발명은 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이들
에 의해 제한되지는 않는다.

실시예 : 세신 추출물 제조

세신 250g을 세절하여 속실팳 장치를 이용하여 70% 메탄올 (750 ml)로 3회 추출하였다. 추출물을 여과한 후, 회전진공농축기(rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축하고, 동결건조하였다(분획 1).

동결건조한 메탄올 추출물 10g을 다른 유기용매로 분획하기 위하여, 200 ml의 메탄올: 물 (4:1)에 녹인 후 2M 황산으로 pH 3으로 조절하여 동량의 클로로포름으로 3회 추출하였다. 클로로포름층은 감압농축 및 동결건조하고(분획 2), 물층은 수산화암모늄(NH_4OH)으로 pH 10으로 조절한 후 동량의 클로로포름:메탄올 (3:1)로 2회 추출하였다. 클로로포름:메탄올(3:1)에 녹는 층을 감압농축 및 동결건조하였다(분획 3). 물층은 동량의 메탄올로 3회 추출하고, 메탄올층(분획 4)과 물층 (분획 5)을 각각 감압농축 및 동결건조하여 시료로 사용하였다.

실험에 1. 그리스 겹 분석시험(Grease Gap assay)

1) 실험방법

백서 대뇌피질의 "웨지(Wedges)"를 제조하여 두 구획의 브레인 배스(two compartment brain bath)에 장치한 후, 시험을 시행하였다[Harrison NL, Simmonds, MA, Quantitative studies on some antagonists of N-methyl D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. Br. J. Pharmacol. 84, 381-391].

뇌를 신속히 꺼내어 뇌조직 절편기를 이용하여 앞쪽 2~3 mm를 제거하고, 나머지 부위를 수직으로 잘라 500~600 μm 두께의 관상 절편(coronal section)을 제조하여 신속히 산화된 크랩스 배지(oxygenated Krebs medium)에 넣은 후, 정중선을 중심으로 2등분하여 대뇌피질과 뇌량(corpus callosum)을 포함하는 대뇌피질쪽이 1.5 mm이고 뇌량쪽은 1 mm인 웨지를 제조하였다. 상온에서 산화된 크랩스 배지에 2시간 방치 후, 웨지들을 두 구획의 브레인 배스(two compartment brain chamber)에 고압 실리콘 그리스(high vacuum silicone grease)를 바른 슬릿사이로 장치하였다. 양쪽 구획 모두 1분당 2 ml의 속도로 크랩스배지를 관류시켰다. 세신추출물(분획 1, 2, 3 및 4)을 대뇌피질쪽의 구획에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 10분전에 미리 투여하기 시작하고, 흥분성 아미노산인 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) (40 μM)를 2분간 투여한 후, 두 구획사이의 d.c.전위를 Ag/AgCl 전극을 통하여 측정하고, 이를 증폭기(amplifier)를 통하여 증폭한 후 맥랩 데이터 포착시스템(McLab Data Acquisition System)을 이용하여 측정하였다.

2) 실험결과

AMPA에 의한 신경세포의 탈분극(depolarization) 유발은 신경세포의 손상에 의한 자극의 척도로 간주되어지고 있다. 실험결과, 도 1A에서 나타난 바와 같이, AMPA 40 μ M을 두 구획의 브레인 배스(two compartment brain bath)에 투여한 경우 0.79 mV의 탈분극이 유도되는 반면, 세신추출물(분획 1)(10 μ g/ml)을 전처리하고 AMPA를 투여한 경우, 탈분극 정도가 현저히 줄어들었음을 알 수 있다. 또한, 도 1B에서 나타난 바와 같이, 세신에 의한 억제효과는 대조군에 비하여 약 54% 정도였다. 따라서, 세신추출물은 AMPA에 의한 신경손상을 보호하는 효과가 현저함을 알 수 있다.

특히, 세신추출물의 분획들(분획 2, 3 및 4)에 대한 실험에 있어서, 분획 2와 분획 3은 AMPA에 의한 탈분극에 큰 영향을 미치지 않았으나, 도 2에 나타난 바와 같이, 분획 4는 대조군에 비하여 92% 정도의 현저한 억제효과를 유발하여 세신추출물 분획들 중 가장 강력한 신경손상보호 효과를 유발하였다.

분획 4는 클로로포름 및 클로로포름:메탄올에 녹지 않는 성분들을 함유하고 있으므로, 클로로포름과 같은 유기용매에 녹는 특성을 가지는 테르페노이드(terpenoids), 페놀성(phenolic) 물질, 지용성 물질인 세사민(sesamin)과 같은 성분들을 제외한, 세신추출물 중의 기타 다른 성분들에 의하여 신경보호작용이 유발됨을 알 수 있다.

실험예 2. 세포 생존율 시험 (MTT assay)

1) 실험방법

MTT 실험은 미토콘드리아 탈수소효소(dehydrogenase)의 활성을 비색정량하여 측정하는 방법으로, 미토콘드리아 산화환원전위(mitochondrial redox potential)나 세포 생존율을 알아보는 데 주로 이용된다(Mosmann et al. 1983).

본 실험에서는 세포의 생존율을 알아보기 위하여, 각각 다른 농도의 세신 추출물이 첨가된 배양액으로 24시간 배양된 세포에, MTT 시약(Sigma, USA) ; 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 PBS(phosphate-buffered saline)에 녹여 여과한 후 최종 0.5 mg/ml의 농도로 각 웰에 첨가하고, 37 °C에서 3시간 배양하였다. 이때 활동하는 미토콘드리아를 가진 살아있는 세포는 테트라졸리움 고리(tetrazolium ring)를 분해하여 짙은 남색의 포르마잔(formazan)을 생성하므로, 이를 녹여내기 위하여 100 μ l DMSO와 10 μ l Sorenson glycine buffer(0.1M glycine, 0.1M NaCl, pH 10.5)를 첨가하고, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광정도를 %세포 생존율로 나타내었다.

2) 실험결과

실험결과 도 3에서와 같이, NGF 처리로 신경세포로 분화를 유도시킨 PC 12 세포에 AMPA (40 μ M)을 투여할 경우 거의 50% 정도의 세포가 죽게되는 반면, 세신 추출물(분획 1) (10 μ g/ml)을 전처리 할 경우 세포의 생존율을 90% 이상으로 회복시키고 있다.

또한, 도 4에서와 같이 실시예 1에서의 분획 2, 분획 3, 분획 4, 분획 5를

시험한 결과, 분획 4가 현저하게 AMPA에 의한 신경세포 손상을 억제하였다.

반면, 도 5에서와 같이 교세포인 C6 아교세포(C6 glial cell)의 경우, AMPA (40 μ M)을 처리하면 약 35%의 세포가 죽게되는 반면, 세신 추출물(분획 1)을 전처리할 경우 세포의 생존율이 약 10% 회복되고 있다.

ZnCl₂는 세포내에서 유리 라디칼을 생성시켜 세포손상을 가하는 물질로써, 도 6에서와 같이 ZnCl₂(100 μ M)을 처리하여 C6 아교세포에 산화적인 손상을 준 후 분획 1, 분획 2, 분획 3, 분획 4 및 분획 5를 시험한 결과, 분획 1은 ZnCl₂에 의한 산화적 손상을 100% 회복시켜 대조군의 상태와 유사하게 세포의 생존율을 유지시켜 주었으며, 분획 4는 ZnCl₂에 의한 산화적 손상을 58% 회복시켜 주고 있음을 발견하였다.

실험예 3. 기억 시험 (NaNO₂ assay)

1. NaNO₂ 기억 시험

NaNO₂에 의한 뇌의 산소대사 결핍과 기억 및 학습과 관련있는 콜린성 신경전도는 서로 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[Schindler등, Nootropic drugs: Animal models for studying effects on cognition. Drug Develop Res 4: 567-576,

1984]. NaNO_2 에 의한 뇌의 산화적 대사(oxidative metabolism) 장애와 콜린성 신경 억제로 인한 기억장애는 서로 밀접한 관련이 있다. 따라서, 약물 처리후 NaNO_2 에 의한 사망유발 시간의 지연이 나타난다면 그것은 그 약물의 기억력 증가효과를 나타내는 척도의 하나로 간주될 수 있다.

1) 실험방법

웅성생쥐(20 g)에 세신추출물(분획 1)을 100 mg/kg, i.p.로 투여하고, 60분 후에 NaNO_2 를 250 mg/kg, s.c.로 주사하고 호흡이 정지할 때까지의 시간을 측정하여, 호흡이 지속되는 시간을 대조군에 비교하여 기억향상효과를 평가하였다.

또한, 메탄올 추출물(분획1)을 다른 유기용매를 이용하여 더 분획하여 제조한 분획 2, 분획 3, 분획 4, 분획 5를 100 mg/kg, i.p.로 마우스에 투여하고, 상기한 방법의 NaNO_2 기억시험을 시행하였다.

2) 실험결과

실험결과 도 7에서 나타난 바와같이, NaNO_2 에 의한 뇌대사 장애로 인한 사망 유도 시간에 비하여, 세신추출물(분획 1) (100 mg/kg, i.p.)을 전처리한 경우 25%의 증가를 유발하므로써 세신에 의한 기억력 증가효과를 나타내었다.

또한, 분획 2, 3, 4 및 5를 실험한 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이, 분획 4는 최초의 메탄올 추출물인 분획 1과 동일한 기억력 증진효과(25% 증가)를 보였으며, 분획 2는 가장 강력한 기억력 증진효과(50% 증가)를 나타내었다.

더욱이, 상기 분획들이 경구투여로 효과가 있는지를 실험하기 위하여, 분획 2를 10 mg/kg용량으로 경구로 투여하고, 60분 후 NaNO₂를 투여하고 호흡이 멈추어 질 때 까지의 시간을 측정한 결과, 대조군에 비하여 50%의 기억력 증진효과를 유발 하였다(도 9).

2. 8방향 방사 미로(8 arm radial maze) 기억시험

NaNO₂ 기억시험에서 현저한 기억력 증진효과를 보인 분획 1, 분획 2 및 분획 4를 이용하여, 직접적인 기억력 증진 효과유무를 밝히기 위하여 8방향 방사 미로(8 arm radial maze) 기억시험을 시행하였다[Ikonen S, Riekkinen Jr. P, Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. European Journal of Pharmacology 382: 151-156, 1999).

1) 실험방법

중앙부위는 직경 20cm이며, 길이 25cm, 높이 15cm, 폭 6cm의 arm 8개로 구성된 미로를 사용하였다. 시험을 시작하기 전 3일간 매일 5분씩 마우스를 연습시켰다. 시험기간 중에는 8개의 arm 중 4개에만 먹이를 두었으며, 각 마우스마다 무작위로 4개씩 지정하였다. 시험은 4개의 먹이 모두가 먹히거나 15분까지만 측정하였다. 실행기억오류(working memory error)는 전에 들렀던 arm을 다시 가는 경우를 정의하며, 참조기억오류(reference memory error)는 먹이를 두지 않은 arm을 가는

경우로 정의하였다(Gamoh S, Hashimoto M, Hossain S, Masumura S, Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 28: 266-270, 2001). 분획 1, 2 및 4 를 각각 매일 1회씩 10 mg/kg을 5일간 경구투여 한 후, 기억시험을 실시하였다.

2) 실험결과

도 10에서 보는 바와 같이, 참조기억오류는 분획 1, 분획 2 및 분획 4를 투여한 경우 대조군에 비하여 각각 38%, 50% 및 50% 감소되었으며, 실행기억오류는 분획 1, 분획 2 및 분획 4를 투여한 경우 대조군에 비하여 각각 48%, 63% 및 74% 감소하였다. 그리고 먹이를 모두 먹는데 걸리는 시간을 측정한 결과, 분획 1, 분획 2 및 분획 4를 투여한 경우 대조군에 비하여 각각 55%, 61% 및 58% 감소시켰다.

실험예 4. 세신추출물의 경구독성시험

1) 실험방법

20 g 정도의 ICR 마우스 25마리를 온도 23 ℃, 상대습도 50%, 조도 150~ 300 룩스(Lux)의 동물실에서 1주일간 사육한 후 각 5마리씩 5군으로 나누어 실험하였다.

실시에에서 얻은 세신 추출물(분획 1)을 0.1 % 트윈(Tween) 80에 녹인 후, 5 그룹의 마우스에 각각 100, 1000, 3000, 5000 및 10000 mg/kg의 용량으로 1회 경구

투여하였다. 투여 후 7일간 일반 증상의 변화 및 사망 동물의 유무를 관찰 하였다.
그리고 투여 7일째 마우스를 치사시켜 해부하고 육안으로 내부 장기를 검사하였다.

2) 실험결과

세신 추출물 투여로 인한 이상 소견은 관찰되지 않았으며, 세신 추출물(분획 1)의 LD₅₀ 값은 3,400 mg/kg으로 나타났다.

제제예 1. 정제

하기의 구성에 따라, 통상의 정제 제조방법으로 각각 제제화하였다.

1-1. 정제 조성물

세신의 메탄올 추출물	500.0 mg
유당	500.0 mg
탈크	5.0 mg
마그네슘 스테아레이트	1.0 mg

1-2. 정제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획	50.0 mg
유당	50.0 mg
탈크	0.5 mg

마그네슘 스테아레이트	0.1 mg
-------------	--------

1-3. 정제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 메탄올 분획	50.0 mg
---------------------	---------

유당	50.0 mg
----	---------

탈크	0.5 mg
----	--------

마그네슘 스테아레이트	0.1 mg
-------------	--------

제제예 2. 캡슐제

하기의 구성에 따라, 다음과 같은 방법으로 캡슐제를 제조하였다.

세신추출물을 체질하여 부형제와 혼합한 후, 젤라틴 캡슐중에 충전하여 캡슐을 제조하였다.

2-1. 캡슐제 조성물

세신의 메탄올 추출물	500.0 mg
-------------	----------

전분 1500	10.0 mg
---------	---------

스테아르산마그네슘 BP	100.0 mg
--------------	----------

2-2. 캡슐제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획	50.0 mg
-----------------------	---------

전분 1500	1.0 mg
스테아르산마그네슘 BP	10.0 mg

2-3. 캡슐제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 메탄올 분획	50.0 mg
전분 1500	1.0 mg
스테아르산마그네슘 BP	10.0 mg

제제예 3. 시럽제

하기의 조성에 따라, 다음과 같은 방법으로 시럽제를 제조하였다.

먼저 정제수에 백당을 용해시켰다. 파라옥시벤조에이트, 파라옥시프로필벤조에이트 및 세신추출물을 가하여 60℃에서 용해시킨 후 냉각하고, 정제수를 가하여 150 ml로 만들었다.

3-1. 시럽제 조성물

세신의 메탄올 추출물	5.0 g
백당	95.1 g
파라옥시벤조에이트	80.0 mg
파라옥시프로필벤조에이트	16.0 mg
정제수	to 150 ml

3-2. 시럽제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획	5.0 g
백당	95.1 g
파라옥시벤조에이트	80.0 mg
파라옥시프로필벤조에이트	16.0 mg
정제수	to 150 ml

3-3. 시럽제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 메탄올 분획	5.0 g
백당	95.1 g
파라옥시벤조에이트	80.0 mg
파라옥시프로필벤조에이트	16.0 mg
정제수	to 150 ml

제제예 4. 액제

하기의 성분을 통상의 액제 제제방법으로 제제화하고, 갈색병에 충전하여 액제를 제조하였다.

4-1. 액제 조성물

세신의 메탄올 추출물	500.0 mg
이성화당	20.0 g
산화방지제	5.0 mg
메틸 파라옥시벤조에이트	2.0 mg
정제수	to 100.0 ml

4-2. 액제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획	500.0 mg
이성화당	20.0 g
산화방지제	5.0 mg
메틸 파라옥시벤조에이트	2.0 mg
정제수	to 100.0 ml

4-3. 액제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 메탄올 분획	500.0 mg
이성화당	20.0 g
산화방지제	5.0 mg
메틸 파라옥시벤조에이트	2.0 mg
정제수	to 100.0 ml

제제예 5. 산제

하기의 성분을 통상의 산제의 제조방법으로 혼합하고, 봉지에 넣어 밀봉한 후 산제를 제조하였다.

5-1. 산제 조성물

세신의 메탄올 추출물	50.0 mg
유당	100.0 mg
탈크	5.0 mg

5-2. 산제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획	50.0 mg
유당	100.0 mg
탈크	5.0 mg

5-3. 산제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 메탄올 분획	50.0 mg
유당	100.0 mg
탈크	5.0 mg

제제예 6. 주사제

하기의 성분을 통상의 주사제의 제조방법으로 2.0 ml의 용량의 앰플에 충전
하고, 멸균시켜 주사제를 제조하였다.

6-1. 주사제 조성물

세신의 메탄올 추출물	50.0 mg
산화방제제	1.0 mg
트윈 80	1.0 mg
주사용 증류수	to 2.0 ml

6-2. 주사제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 클로로포름 분획	50.0 mg
산화방제제	1.0 mg
트윈 80	1.0 mg
주사용 증류수	to 2.0 ml

6-3. 주사제 조성물

세신의 메탄올 추출물의 메탄올 분획	50.0 mg
산화방제제	1.0 mg
트윈 80	1.0 mg
주사용 증류수	to 2.0 ml

【발명의 효과】

세신 추출물을 포함하는 조성물은, 세신추출물의 뇌세포 보호기능으로 인해 뇌세포 손상으로 발생하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료 효과 뿐 아니라, 기억력 향상 유발 효과를 나타내며, 각종 환경적 스트레스로 인한 뇌 손상의 위험을 안고 있는 현대인의 뇌세포 보호 기능 및 치매환자를 포함하는 기억력이 저하된 사람에게 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

세신추출물을 포함하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 세신추출물이 전체 조성물에 대하여 0.5~ 50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 세신추출물이 세신을 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트 등의 유기용매의 추출용매로 추출하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 세신추출물이 제 3항에 따른 방법으로 얻어진 세신추출물을 메탄올:물 혼합용매에 녹이고, 산으로 pH 2~4로 조절하여 동량의 클로로포름으로 추출한 후, 클로로포름에 용해되지 않는 분획부를 수산화암모늄으로 pH 9~ 12로 조절하여 동량의 클로로포름:메탄올 혼합용매로 추출하고, 이 중 클로로포름:메탄올 혼합용매에 용해되지 않는 분획부를 메탄올로 더 추출, 분획함으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 산제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 뇌세포 보호 및 기억력 증진용 조성물.

【청구항 7】

세신을 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 및 아세톤, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 에테르, 에틸아세테이트 등의 유기용매의 추출용매로 추출하고, 이로부터 얻어진 세신추출물을 메탄올:물 혼합용매에 녹인 후 산으로 pH 2~4로 조절하고, 동량의 클로로포름으로 더 추출함으로써 얻어진 분획물을 포함하는 것을 특징으로 하는 기억력 증진용 조성물.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 분획물이 조성물 총중량에 대하여 0.5~ 50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 기억력 증진용 조성물.

【청구항 9】

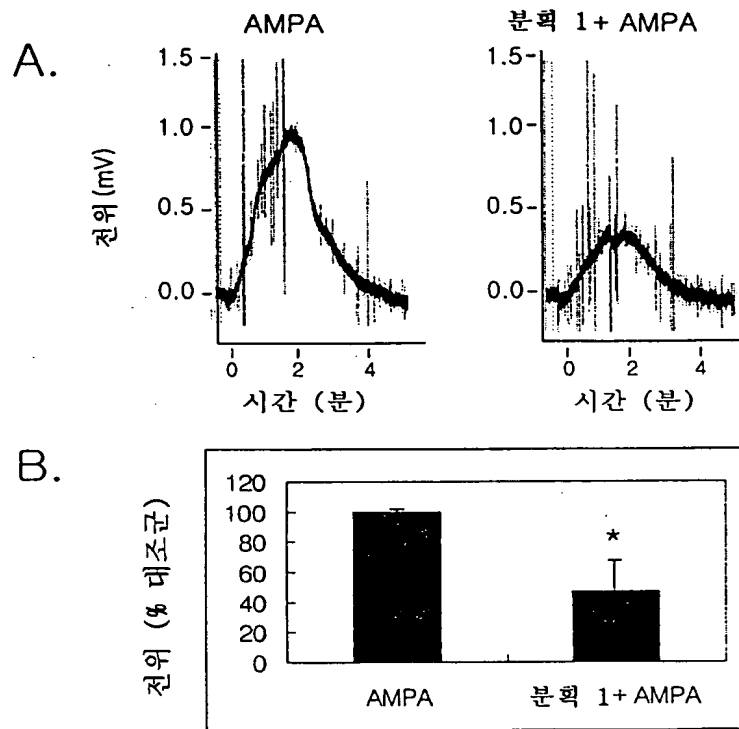
제 7항에 있어서, 담제, 부형제 및 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 기억력 증진용 조성물.

【청구항 10】

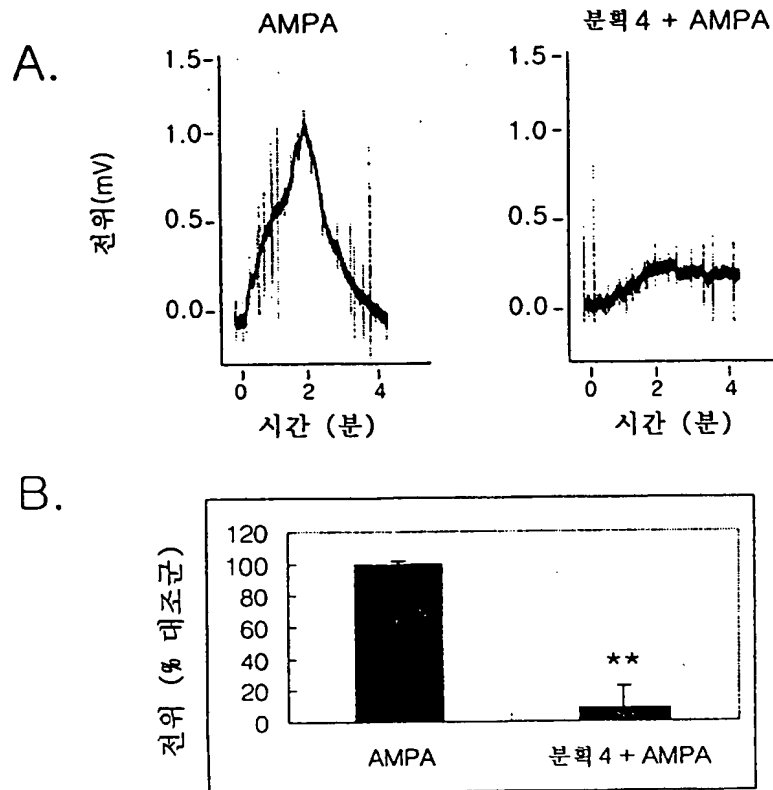
제 7항에 있어서, 산제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되는 것을 특징으로 하는 기억력 증진용 조성물.

【도면】

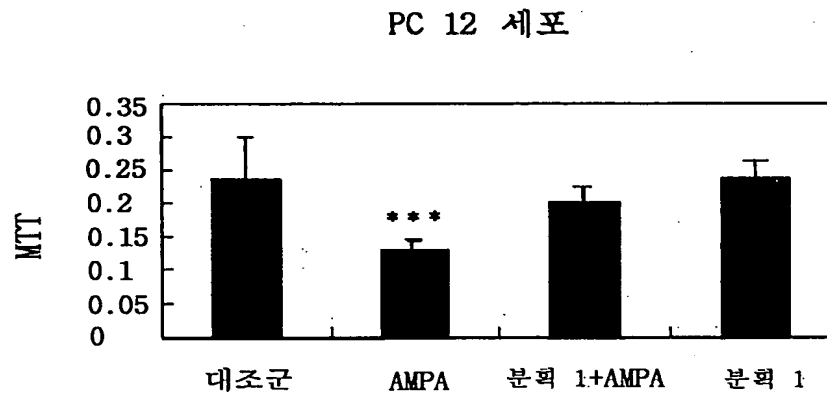
【도 1】



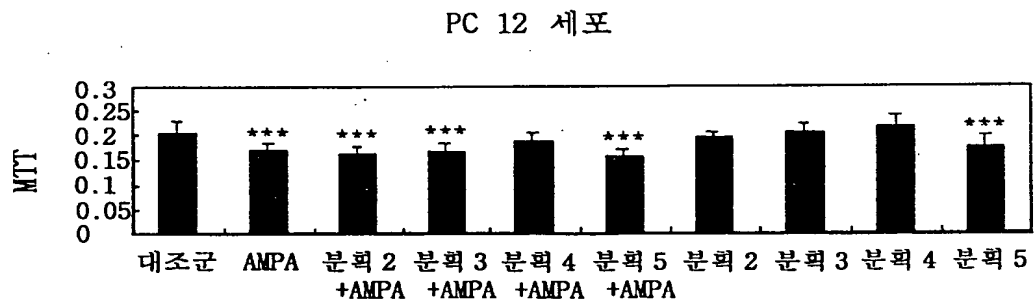
【도 2】



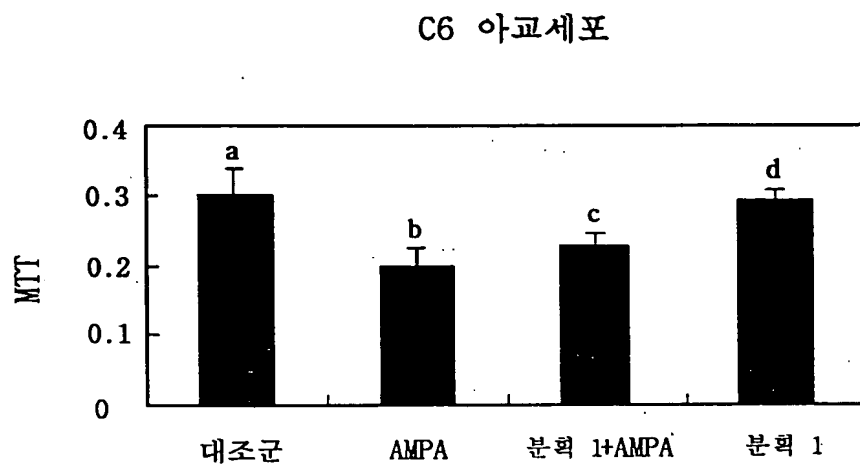
【도 3】



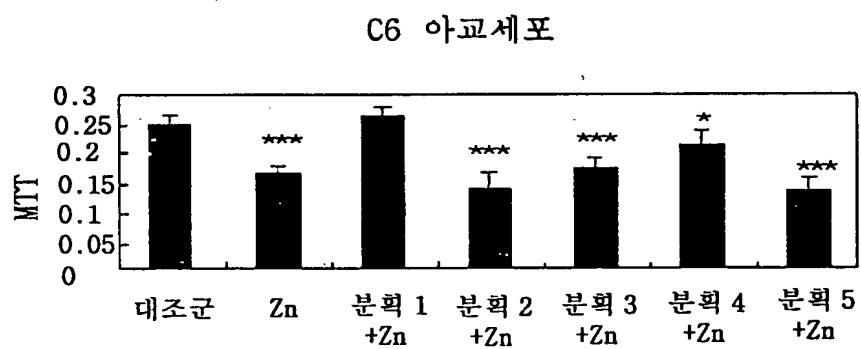
【도 4】



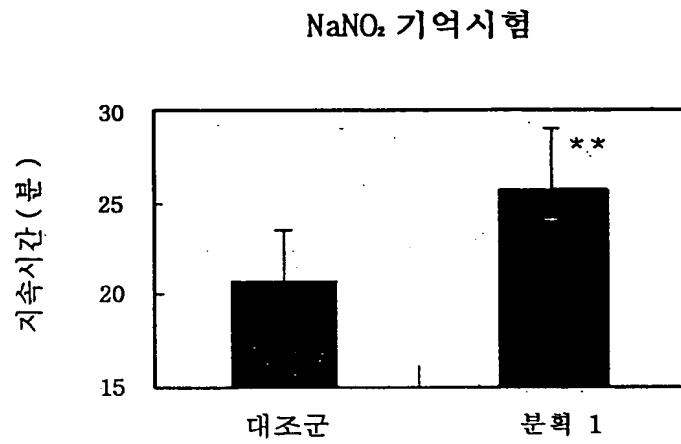
【도 5】



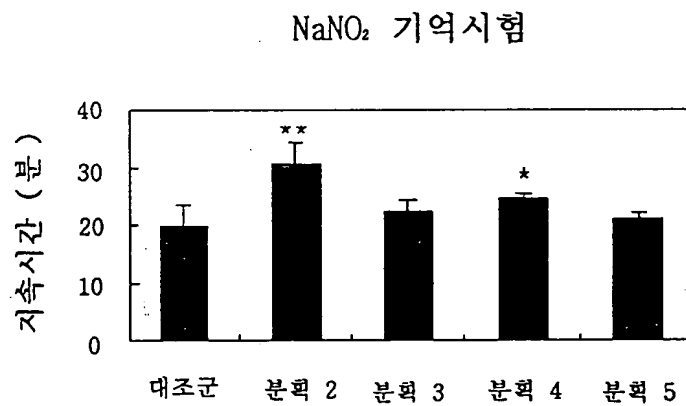
【도 6】



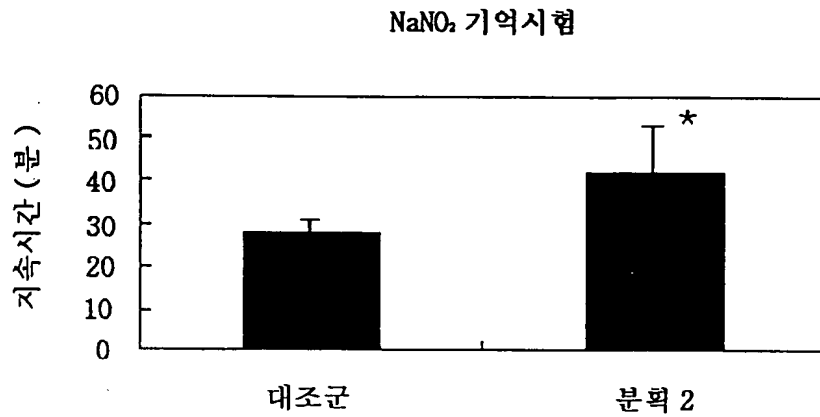
【도 7】



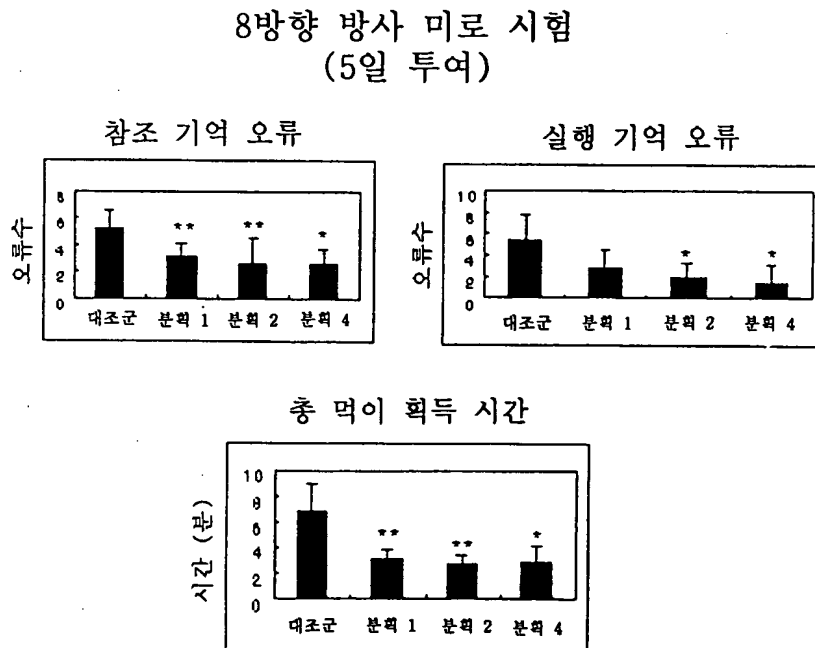
【도 8】



【도 9】



【도 10】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.